Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 2, June. July. 2018, p. 347- 357

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 2، خرداد- تیر 1397 ص 357 - 347

# تهیه فیلم‌های آنتی‌لیستریایی متیل‌سلولز، کازئینات سدیم و باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608

هدی قیومی[1]- محمدعلی نجفی[2*]- محمد رهنما[3]- ناصر سلطانی تهرانی[4]

تاریخ دریافت: 1395/09/25
تاریخ پذیرش: 1395/12/25

## چکیده

در این تحقیق سعی گردید تا با استفاده از بیوپلیمرهای کازئینات سدیم و متیل سلولز فیلم مناسب جهت کنترل رشد باکتری *لیستریا اینوکوا* IBRC-M10799 تهیه گردد. بدین منظور باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC1608 به تعداد $10^6$CFU/cm² مستقیما به محلول سازنده فیلم‌های کازئینات سدیم و متیل سلولز افزوده، سپس در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و مدت 24 ساعت خشک شدند. تاثیر باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC1608 بر خصوصیات فیلم شامل نفوذپذیری بخار آب، کدورت و مکانیکی ارزیابی شد. همچنین اثر مهارکنندگی فیلم‌ها بر باکتری‌های *لیستریا اینوکوا* IBRC-M10799 و نرخ زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC1608 طی 12 روز (در دمای 5 درجه سانتی‌گراد) بررسی گردید. ارزیابی‌های آزمایشگاهی نشان داد حضور باکتری اسید لاکتیک در فیلم‌ها به‌طور معنی‌داری سبب افزایش شفافیت، نفوذپذیری بخارآب و مقدار کشش‌پذیری و همچنین کاهش معنی‌دار مقاومت کششی و مدول الاستیسیته شد. نرخ زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC*1608* در فیلم سدیم کازئینات به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. بیشترین و کمترین مقدار نرخ بازداری *لیستریا اینوکوا* IBRC-M10799 در فیلم متیل سلولز به‌ترتیب در روزهای چهارم (86%) و دوازدهم (27 %) مشاهده گردید ($p<0/05$) . اما از روز هشتم به بعد فیلم زیست‌فعال کازئینات سدیم توانایی مهار بالاتری نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد نوع پلیمر نقش کلیدی در خواص ضد باکتریایی و فیزیکی فیلم زیست فعال دارد.

**واژه‌های کلیدی:** بیوپلیمر، باکتری اسیدلاکتیک، *لیستریا اینوکوا*

## مقدمه

طی سال‌های اخیر به دنبال افزایش علاقه مصرف‌کنندگان به غذاهای آماده، مباحث کنترل کیفیت موادغذایی چشم‌گیرتر شده است. مصرف‌کنندگان، غذاهایی با حداقل فرآوری و حداکثر کیفیت را ترجیح می‌دهند. بنابراین استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی مانند کلریدها، نیتریت‌ها، سولفیت‌ها و اسیدهای‌آلی چون لاکتیک، اسکوربیک و سوربیک رواج یافت (Jayasena *et al*., 2013). افزودنی‌های سنتزی مانند نیتریت به دلیل اثرات سمی و سرطان‌زایی برای انسان مورد سوال قرار گرفته‌اند، به‌طوری که در برخی از کشورها استفاده از آن را محدود نموده‌اند. استفاده از روش‌های جایگزین مانند کاربرد باکتری‌های اسید لاکتیک و نیز متابولیت‌های ضدمیکروبی در بسته‌بندی‌های مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است. این ترکیبات از سوی سازمان غذا و دارو آمریکا FDA مجاز و GRAS شناخته شده‌اند. از سویی دیگر مشکلات زیست‌محیطی و دفع زباله‌های پلاستیکی، موجب شد تا استفاده از پوشش‌های خوراکی تجدیدپذیر اهمیت یابند. پوشش‌های خوراکی ترکیبات بیوپلیمری نازکی هستندکه از قابلیت مناسبی جهت بسته‌بندی موادغذایی (Bourtoom, 2008) برخوردار بوده و با کاهش سرعت واکنش‌های مضر شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی در کنترل عمر انبارمانی موثرند (Falguera *el al*., 2011). اخیرا کاربرد نگه‌دارنده‌های طبیعی در بیوپلیمرهای بسته‌بندی مواد غذایی تحت عنوان بسته‌بندی فعال گسترش پیدا کرده است (Galotto *et al*., 2015). ترکیب پایه فیلم‌های خوراکی عمدتا ترکیبات هیدروکلوئیدی می‌باشند که از قابلیت حمل و نگهداری باکتری‌های اسیدلاکتیک (Beristain-Bauza *et al*., 2016) برخوردارند. از جمله بیوپلیمرهای مورد استفاده در ساخت فیلم، متیل‌سلولز می‌باشد. این ماده پلی‌ساکارید آنیونی خطی است که از واحدهای ($\beta$1-4) گلوکزیدی تشکیل و از ترکیب سلولز با هیدروکسیدسدیم و کلریدمتیل ساخته می‌شود. این فیلم حلال در آب بوده و خصوصیات ممانعت‌کنندگی بالایی در برابر اکسیژن و لیپید دارد

1، 2، 3 و 4- به‌ترتیب دانشجو کارشناسی‌ارشد، استادیار، دانشیار و مربی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه زابل.
(*مسئول مکاتبات: Email: najafi413@yahoo.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1396i0.61074

(Aminabhavi *et al.*, 2008). کازئینات سدیم یکی دیگر از بیوپلیمرهای رایج در ساخت فیلم خوراکی می‌باشد. پروتئین کازئین، رشته‌ای شکل با ساختار مارپیچ تصادفی است و در شیر به‌صورت میسل حضور دارد. میسل‌های کازئین از بخش‌های آلفاکازئین (46درصد)، بتاکازئین (34 درصد)، گاماکازئین (7 درصد)، فسفات کلسیم و یون‌های سیترات و منیزیوم تشکیل شده‌اند. فیلم حاصل از کازئینات ارزش غذایی، خواص مکانیکی و ممانعت‌کنندگی بالایی در برابر هوا دارد (Schou *et al.*, 2004). تحقیقات نشان داده زمان تاثیر باکتریوسین‌های مورد استفاده در لفاف‌های بسته‌بندی مواد غذایی کوتاه است (Kristo *et al.*, 2008). از روش‌های مهار باکتری‌های بیماری‌زا و فسادزا کاربرد باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌باشد (Alegre *et a*l., 2011). به‌منظور حل این مشکل تلقیح باکتری‌های اسیدلاکتیک به ماتریکس پلیمر ارزیابی گردید. Sanchez-Gonzalez و همکاران (2014) گزارش کردند فیلم‌های سدیم کازئینات و متیل‌سلولز حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس روتری* به مدت یک هفته توانایی مهار کامل *لیستریا اینوکوا* را در محیط آزمایشگاهی داشتند. این نوع بسته‌بندی‌ها می‌تواند رویکرد جدیدی در مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا و جایگزین مناسبی برای نگهداری مواد غذایی باشد ( Kanmani *et al.*, 2013; Odila Pereira *et al.*, 2016). از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا و فسادزا می‌توان به جنس *لیستریا* اشاره نمود. این جنس شامل چندین گونه، *لیستریا منوسیتوژنز*، *لیستریا اینوکوا*،[1] *لیستریا ایوانووی*،[2] *لیستریا سیلیگری*[3] می‌باشد. مهمترین گونه آن *لیستریا منوسیتوژنز* است این باکتری شرایط فعالیت آبی و دمای پایین را تحمل نموده و می‌تواند مواد غذایی را در طی مراحل آماده‌سازی و بسته‌بندی آلوده نماید. *لیستریا منوسیتوژنز* همچنین قادر است باعث افزایش تعداد مونوسیت‌های خون، نازائی، سقط جنین و آنسفالیت گردد (Barmpalia *el al.*, 2005). از گونه‌های *لاکتوباسیلوس* می‌توان به *لاکتوباسیلوس کازئی*[4] اشاره نمود، این باکتری میله‌ای شکل، هتروفرمانتیو اختیاری بوده و در محدوده دمایی 45-10 درجه سانتی‌گراد رشد می‌نماید (Vescovo *et al.*, 2006). گزارش شده ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* می‌تواند رشد *لیستریا منوسیتوژنز* را مهار کند (Martinez *et al.*, 2005). هدف از این پژوهش تهیه فیلم خوراکی جدید بر پایه گنجاندن *لاکتوباسیلوس کازئی 1608* PTCC (*ل. کازئی*1608) در ماتریکس فیلم‌های کازئینات سدیم و متیل‌سلولز می‌باشد. در تحقیق پیش رو تاثیر باکتری اسیدلاکتیک بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، مکانیکی و ساختاری فیلم‌ها و نیز فعالیت ضدلیستریایی فیلم‌های تهیه شده در شرایط آزمایشگاهی تعیین گردید. در این پژوهش باکتری *ل. اینوکوا* 10799 به دلیل مشابهت فیزیولوژیکی با *لیستریا منوسیتوژنز* و غیر بیماری‌زا بودن جایگزین شد (Banada *et al.*,2007).

1 *Listeria Innocua*
2 *Ivanovii*
3 *Listeria Seeligeri*
4 *Lactobacillus .Casei*

## مواد و روش‌ها

باکتری *ل. کازئی*1608 از کلکسیون کشت میکروبی ایران و *لیستریا اینوکوا* 10799 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه گردیدند. جهت تکثیر و تهیه سوسپانسیون‌های باکتری *ل. کازئی1608* (Vescovo *et al.*, 2006) و *لیستریا اینوکوا*10799( Castro *et al.*, 2017) به‌ترتیب از محیط کشت MRS[5] مایع (لیوفیلکم ایتالیا) و BHI[6] مایع ( لیوفیلکم ایتالیا) استفاده شد. باکتری‌های *ل. کازئی1608*و *لیستریا اینوکوا* 10799 تلقیح شده در محیط مایع به‌ترتیب در دمای 30 و 37 درجه سانتی‌گراد، مدت زمان 24 ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. منحنی رشد جمعیت سوسپانسون *ل. کازئی*1608 و *لیستریا اینوکوا* 10799 به روش پورپلیت و کدورت‌سنجی در طول موج OD=600 نانومتر (Corcoran *et al.*, 2007) رسم گردید. نمونه‌های کشت باکتریایی *ل. کازئی*1608 ($10^6$ Cfu/ml) و *لیستریا اینوکوا* 10799 ($10^2$ Cfu/ml) با شتاب 3500g به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ (Eppendorf 5810، آلمان) و رسوب به‌دست آمده پس از دو بار شستشو با محلول فسفات بافر سالین[7](pH=7) جهت تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

### آماده‌سازی فیلم‌ها

جهت تهیه سوسپانسیون سازنده فیلم متیل سلولز مقدار 4 گرم پودر متیل سلولز در آب مقطر استریل در دمای محیط حل، و 1 گرم گلیسرول به محلول فیلم به نسبت 0/25 به 1 وزنی/ وزنی اضافه شد. سپس توسط هموژنایزر (اولتراتراکس، T 25، آلمان) با سرعت 13500 دور بر دقیقه به مدت 4 دقیقه همگن گردید. در مرحله بعد هواگیری به کمک پمپ خلا (jencons، انگلستان) در دمای اتاق انجام شد (Sanchez- Gonzalez *et al.*, 2014). جهت تهیه سوسپانسیون سازنده فیلم کازئینات سدیم، مقدار 5 گرم پودر کازئینات سدیم به 100 میلی‌لیتر آب مقطر حاوی 1/5گرم گلیسرول در دمای 5±65 درجه‌سانتی‌گراد اضافه و پس از انحلال کامل، دمای سوسپانسیون کازئینات سدیم تا 5±85 درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. سوسپانسیون به مدت 1 ساعت در این دما همزده، سپس توسط پمپ

5 de Man, Rogosa and Sharpe
6 Blood Heat Infusion Broth
7 Phosphate Buffer Saline

خلا هواگیری شد (Borumand *et al*., 2011). در ادامه جهت تهیه فیلم زیستی، باکتری *ل. کازئی*1608 طبق روش Sanchez-Gonzalez و همکاران (2013) تکثیر و پس از دو بار شستشو، به‌ترتیب مقادیر 300 و 240 میکرولیتر ازسوسپانسیون ل. کازئی 1608 به 98 میلی‌لیتر سوسپانسیون کازئینات سدیم و متیل سلولز فیلم افزوده و به مدت 5 دقیقه توسط همزن مخلوط شد. این نسبت با هدف ایجاد $10^6$CFU/cm² میکروب در فیلم خشک شده انتخاب گردید. سپس محلول فیلم را به داخل ظرف‌های پلاستیکی ( 25×25 سانتی‌متر) ریخته و در آون با دمای 25درجه سانتی‌گراد طی مدت 24 ساعت خشک گردیدند. تمامی مراحل انجام کار با تکنیک آسپتیک و در شرایط استریل انجام شد. دانسیته تمامی نمونه های فیلم برحسب وزن خشک 52/2 g/m² و متوسط ضخامت فیلم‌های به‌دست آمده 0/71±0/05 میلی‌متر بود. فیلم‌های بدون باکتری اسیدلاکتیک به‌عنوان فیلم‌های کنترل در نظر گرفته شدند. همه فیلم‌ها قبل از آزمون‌های فیزیکی و مکانیکی به‌منظور مشروط شدن یک هفته در دسیکاتور با دمای 5 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 75% قرار داده شدند (Sanchez- Gonzalez *et al*., 2014). به‌منظور تامین رطوبت 75% از محلول فوق اشباع نمک کلرید سدیم استفاده گردید.

### فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های حاوی *ل. کازئی1608*

فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها طبق روش Kristo و همکاران (2008) انجام گردید. بر این اساس مقدار 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *لیستریا اینوکولا* 10799 بر روی محیط کشت TSA[1] تلقیح و کشت سطحی داده شد. تلقیح به گونه‌ای انجام گرفت که غلظت نهایی *لیستریا اینوکولا* 10799 در سطح محیط کشت $10^2$CFU/cm² سلول باشد. سپس فیلم‌های شاهد و زیست فعال بر روی محیط‌های کشت TSA آلوده به باکتری *لیستریا اینوکولا* 10799 قرار گرفته و در دمای 5 درجه سانتی‌گراد به مدت 12 روز نگهداری شدند. تعداد باکتری *لیستریا* و *ل. کازئی*1608 در روزهای صفر، 4، 8 و 12 شمارش گردیدند. نمونه‌ها در شرایط کاملا استریل به‌همراه 100 میلی‌لیتر فسفات بافر سالین به کیسه استومیکر انتقال داده و به مدت 2 دقیقه توسط دستگاه استومیکر همگن و رقت‌های متوالی تهیه گردید. درنهایت کشت میکروبی بر روی محیط کشت MRS آگار برای *ل. کازئی* 1608 و PALCAM[2] آگار برای *لیستریا اینوکولا* 10799 انجام گرفت. پلیت‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و بعد از 48 ساعت شمارش انجام گردید. تمامی آزمون‌های میکروبی در سه تکرار انجام شدند. نرخ بازداری باکتری *لیستریا اینوکولا* 10799 و زنده‌مانی *ل. کازئی* 1608 به‌ترتیب طبق فرمول (1) و (2) محاسبه گردید (Zheng and Zhu, 2003).

$$\text{نرخ بازداری}(\%) = \frac{N0-N1}{N0} \times 100 \qquad (1)$$

$N_0$: تعداد اولیه کلنی باکتری بیماری‌زا

$N_1$: تعداد نهایی کلنی باکتری بیماری‌زا در زمان آزمایش

$$\text{نرخ‌زنده‌مانی}(\%) = \frac{N}{N0} \times 100 \qquad (2)$$

$N_0$: تعداد اسیدلاکتیک باکتری زنده اولیه

$N_1$: تعداد اسیدلاکتیک باکتری زنده در زمان آزمایش

### خواص مکانیکی

آزمایشات مکانیکی با استفاده از دستگاه بافت‌سنج (Testometric، M350-10CT، انگلستان) انجام شد. نمونه‌های فیلم متعادل شده در رطوبت نسبی 75% و دمای 5 درجه سانتی‌گراد به شکل مستطیلی به ابعاد 100×5/4 میلی‌متر طبق استاندارد ASTM D-882 (ASTM, 2001) بریده شدند. فاصله بین دو فک دستگاه 50 میلی‌متر و سرعت حرکت فک‌ها 50 میلی‌متر بر دقیقه انتخاب شد. مقاومت کششی (TS)، درصد ازدیاد طول (E%) و مدول‌الاستیک (EM) برای هر فیلم اندازه‌گیری گردید.

### نفوذپذیری به بخار آب[3]

اندازه‌گیری نفوذپذیری بخار آب فیلم طبق روش Sanchez-Gonzalez و همکاران (2014) با کمی تغییرات انجام گرفت. برای انجام آزمایش از ویال‌های شیشه‌ای با قطر خارجی 2cm استفاده گردید. 10 میلی‌لیتر آب مقطر به داخل ویال افزوده و نمونه‌های فیلم بر روی ویال به کمک پارافیلم محکم گردیدند. سپس در دسیکاتور با رطوبت نسبی 75% و دمای 5 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. انتقال بخارآب فیلم از طریق کاهش وزن فنجان‌ها هر 12 ساعت یک‌بار با ترازوی 0/0001 اندازه‌گیری گردید. با استفاده از شیب منحنی نمودار کاهش وزن بر حسب زمان تقسیم بر مساحت فیلم (A,m²)، آهنگ انتقال بخار آب (WVTR) محاسبه و نفوذپذیری به بخار آب طبق فرمول (3) محاسبه گردید.

$$\text{نفوذپذیری بخارآب} = \frac{WVTR \times d}{\Delta P} \qquad (3)$$

d= ضخامت نمونه فیلم (mm)، Δp= اختلاف فشار بخارآب در سراسر فیلم (Kpa)

### کدورت

جهت تعیین کدورت فیلم‌ها طبق روش (Nu nez-Floraes *et*

1 Tryptone Soy Agar

2 Palcam Listeria-Selective

3Water Vapor Permeability

*al*., 2012) عمل گردید بر این اساس ابتدا نمونه فیلم به شکل مستطیل در ابعاد 0/7×1/5 سانتی‌متر بریده و داخل سل اسپکتروفتومتری (cecil، انگلستان) قرار داده شدند. مقدار جذب در طول موج 650 نانومتر و در سه تکرار اندازه‌گیری گردید. کدورت فیلم‌های مختلف از تقسیم طیف جذب بر ضخامت فیلم (mm) طبق فرمول (4) محاسبه شد.

(4) ضخامت فیلم (میلی‌متر)/جذب (650 نانومتر)=کدورت

### ریزساختار SEM

برای بررسی ریز ساختار از میکروسکوپ الکترونی طبق روش Seyedi و همکاران (2014) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا فیلم در ازت مایع منجمد و سپس خرد و سپس بروی پایه آلومینیومی چسبانده شد. در نهایت نمونه‌های فیلم با لایه نازکی از طلا پوشانده و با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی (KYKY، 3200) باولتاژ 26 کیلوولت (KV) تصاویر تهیه شدند.

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمون‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل و با سه تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل اختلاف‌ها توسط نرم‌افزار SAS نسخه 9/1 تعیین شد. مقایسه میانگین داده‌های فیزیکی و میکروبی به‌ترتیب به کمک آزمون دانکن و توکی انجام شد.

## نتایج و بحث

### نرخ زنده‌مانی *ل. کازئی* 1608 و فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها در برابر *لیستریا اینوکوا* 10799

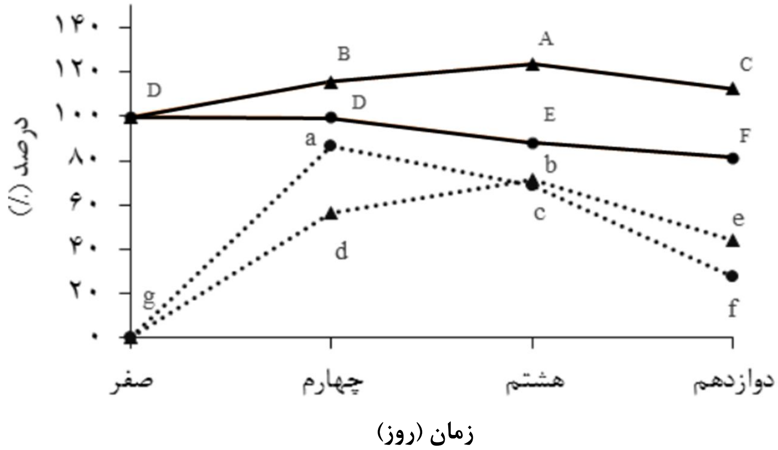
مقایسه میانگین‌های نرخ زنده‌مانی *ل. کازئی* 1608 و نیز اثر بازدارندگی *لیستریا اینوکوا* 10799 فیلم‌های تهیه شده در شکل 1 آورده شده است. آنالیز داده‌ها نشان دادند نرخ زنده‌مانی *ل.کازئی* 1608 در فیلم سدیم کازئینات نسبت به متیل سلولز به‌صورت معنی‌داری بیشتر بوده است (p<0/05). مقایسه روند تغییرات نرخ زنده‌مانی نیز تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد که بیشترین نرخ زنده‌مانی *ل.کازئی* 1608 در فیلم‌های کازئینات سدیم و متیل سلولز به‌ترتیب در روزهای هشتم (123/8%) و اول (100%) مشاهده گردید. در مجموع کمترین نرخ زنده‌مانی در فیلم متیل سلولز و در روز دوازدهم 81% دیده شد (p<0/05). بالا بودن توانایی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس‌ها در ماتریکس پروتئینی می‌تواند به دلیل‌ظرفیت بافری بالا و تامین مواد مغذی (پپتید و آمینواسید) باشد (Leonard *et al*., 2014). در همین راستا Sanchez-Gonzalez و همکاران (2014) بیان کردند توانایی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس‌های *اسیدوفیلوس و روتری* در ماتریکس پروتئینی نسبت به بیوپلیمر سلولزی بالاتر است که با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. بررسی تصاویر میکروسکوپ‌الکترونی SEM (شکل2) نشان می‌دهد *ل. کازئی* 1608 (اجزاء لوبیایی شکل) به‌طور مناسب در ماتریکس کازئینات سدیم قرار گرفته که می‌تواند یکی از دلایل بالا بودن توانایی زنده‌مانی در این ماتریکس باشد. کاهش نرخ زنده‌مانی *ل. کازئی* 1608 در فیلم کازئینات سدیم از روز هشتم به بعد می‌تواند به دلیل افزایش استرس اسمزی و تراکم متابولیت‌های باکتری در محیط اطراف باشد (Kanmani *et al*., 2013).

تحلیل داده‌های مربوط به اثر مهارکنندگی بر روی رشد *لیستریا اینوکوا* 10799 طی مدت 12 روز و در شرایط آزمایشگاهی (شکل1) بیانگر آن است که فیلم‌های متیل سلولز و کازئینات سدیم حاوی *ل. کازئی* 1608 در تمام روزها دارای اثر مهارکنندگی معنی‌داری می‌باشند (p<0/05). به طوری که بیشترین اثر بازداری در روز چهارم و در فیلم متیل‌سلولز مشاهده گردید (p<0/05). احتمالا ایجاد تنش در متابولیسم سلولی میکروب باعث افزایش تولید ترکیبات ضدمیکروبی (باکتریوسین، اسیدهای آلی هیدروژن پراکسید و...) گردیده است (Gálvez *et al*., 2007). همچنین کمترین مقدار اثر بازدارندگی *لیستریا اینوکوا* 10799 در فیلم متیل سلولز و در روز دوازدهم مشاهده شد که با کاهش جمعیت باکتری اسیدلاکتیک در درون فیلم مطابقت دارد (Bevilacqua *et al*., 2010). از طرفی فیلم سدیم کازئینات از روز هشتم به بعد نرخ بازداری بیشتری نسبت به فیلم متیل سلولز نشان داد (p<0/05). که می‌تواند ناشی از توانایی بالا زنده‌مانی *ل.کازئی* 1608 در ماتریکس کازئینات سدیم نسبت به متیل سلولز باشد (Leonard *et al*., 2014). همچنین نتایج حاصل از تحلیل آماری نشان داد فیلم‌های کنترل هیچ گونه اثر بازدارندگی بر روی رشد *لیستریا اینوکوا* 10799 ندارند (p>0/05) (نتایج نشان داده نشده است). Gialamas و همکاران (2010) بیان کردند پوشش سدیم کازئینات حاوی *لاکتوباسیلوس ساکی* سبب مهار4 سیکل لگاریتمی *لیستریا منوسیتوژنز* نسبت به نمونه فیلم بدون لاکتوباسیلوس گردید که نشان‌دهنده تاثیر باکتری‌های اسیدلاکتیک مهار شده درون پوشش بر باکتری‌های مولد فساد می‌باشد

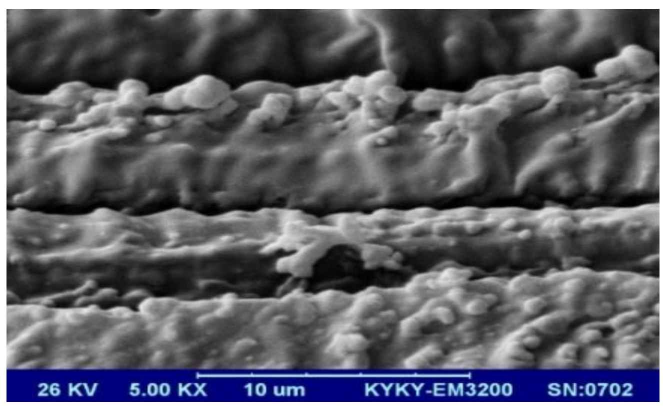
### خصوصیات مکانیکی فیلم

همانطور که در شکل3 نشان داده شده است. نوع فیلم در خصوصیات مکانیکی تاثیر معناداری دارد (شکل3 الف، ب، ج) (p</05). به‌طوری‌که فیلم متیل سلولز مقاومت‌کششی (26/9 مگاپاسکال)، مدول الاستیک (480 مگاپاسکال) و درصد طویل شدن (27/3%) بالاتری نسبت به فیلم کازئینات سدیم نشان داد. احتمالا بالا بودن مقادیر خواص فیزیکی فیلم متیل سلولز نسبت به کازئینات

سدیم، همانطور که شکل4 نشان می‌دهد، می‌تواند ناشـی از سـاختار یکنواخت و همگن این فیلم می‌باشد. افزودن *ل. کـازئی*1608 سـبب کاهش مقاومت‌کششی، مدول الاستیسیته و افـزایش کشـش‌پـذیری فیلم‌ها گردید (p<0/05).




**شکل1- اثر زمان بر نرخ زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608(——) و بازدارندگی *لیستریا اینوکوا* IBRC-M 10799 (......). ماتریکس کازئینات سدیم (▲) و متیل سلولز(●)**، حروف غیرمشابه بزرگ و کوچک بترتیب بیانگر تفاوت معنی‌دار مقادیر میانگین نرخ زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی*PTCC1608 و بازدارندگی *لیستریا اینوکوا* IBRC-M10799 می‌باشند (p<0/05).




**شکل2- تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطع عرضی فیلم کازئینات سدیم حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی*PTCC1608 . با بزرگنمایی×5000**

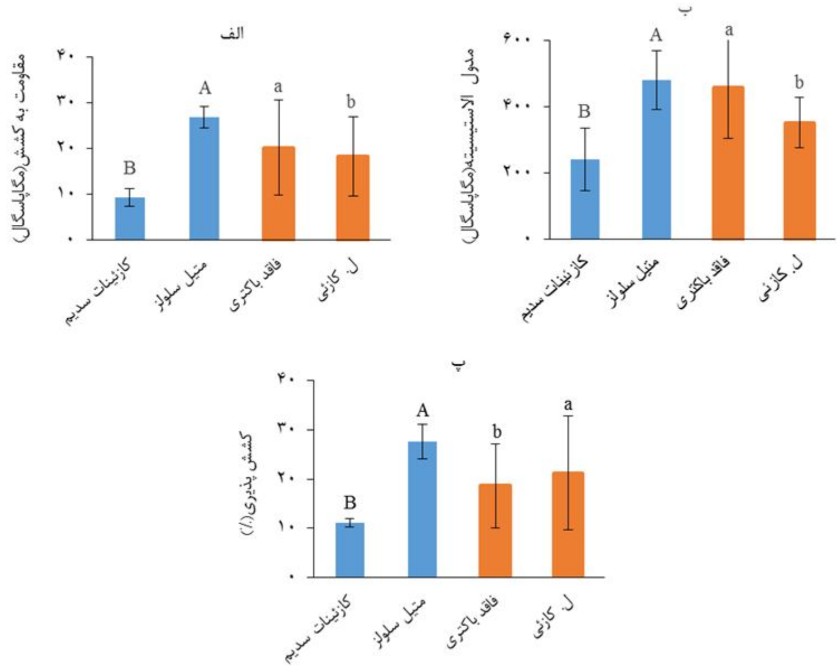
گزارشات متعددی در دست اسـت کـه نشـان مـی‌دهنـد حضـور لاکتوباسیلوس در ماتریکس بیوپلیمر سبب کاهش مقاومت به کشش و عدم تغییر مدول الاستیسیته و کشش‌پذیری گردیده است (Odila Pereira *et al*.,2016; Beristain- Bauza *et al*., 2016). Sanchez-Gonzalez و همکـاران (2014) بیـان کردنـد حضـور *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* سبب کاهش مدول الاستیسیته و افزایش کشش‌پذیری در فیلم متیل سلولز و عدم تغییر خصوصیات مکـانیکی در فیلم سدیم کازئینات گردید. خصوصیات مکانیکی فـیلم‌هـا تحـت تاثیر ساختار به هم پیوسته ماتریکس فیلم است. احتمالا تلقیح باکتری باعث می‌شود پیوندهای شبکه پلیمر تغییر کرده و در نتیجـه سـاختار منسجم ماتریکس متیل سـلولز و بـه دنبـال آن مقاومـت مکـانیکی کاهش یابد (Chambi *et al*., 2006).

## نفوذپذیری بخار آب فیلم

نفوذپذیری به بخار آب یکی از مهم‌ترین پارامترهای بیان‌کننـده خصوصیات عملکردی فیلم می‌باشـد. نتـایج حاصـل از ارزیـابی ایـن ویژگی نشان می‌دهد (شکل5) نوع فیلم بر مقدار نفوذپذیری به بخـار آب تاثیر معناداری دارد (p<0/05). به نحوی که فیلم کازئینات سدیم

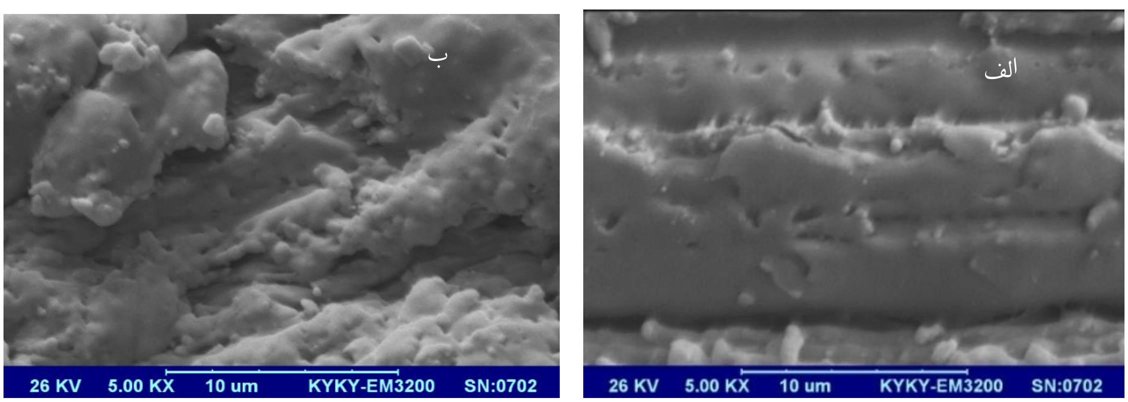
نفوذپذیری بالاتری نسبت به متیل سلولز دارد. این مهم می‌تواند احتمالا ناشی از تفاوت ساختار ملکولی پلیمرها باشد (Beristain-Bauza *et al.*, 2016).

نتایج حاصل از داده‌ها نشان داد حضور *ل. کازئی*1608 بر قابلیت نفوذپذیری بخار آب فیلم‌ها تاثیر داشت به‌صورتی که در مقایسه با نمونه‌های فاقد میکروب به‌طور معنی‌داری باعث افزایش مقدار نفوذپذیری به بخار آب گردید. Sanchez-Gonzalez و همکاران (2014) بیان کردند حضور لاکتوباسیلوس در ساختار فیلم زیستی سبب افزایش نفوذپذیری بخار آب گردیده است. تصاویر SEM (شکل2 و6) فیلم‌های زیستی تهیه شده نشان می‌دهد حضور *ل. کازئی* 1608 در فیلم باعث ایجاد ناپیوستگی‌هایی در ماتریکس گردیده است. این خصوصیت می تواند باعث افزایش قابلیت جابه‌جایی زنجیرهای پلیمری و انتقال مولکول های آب گردد (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2013) .

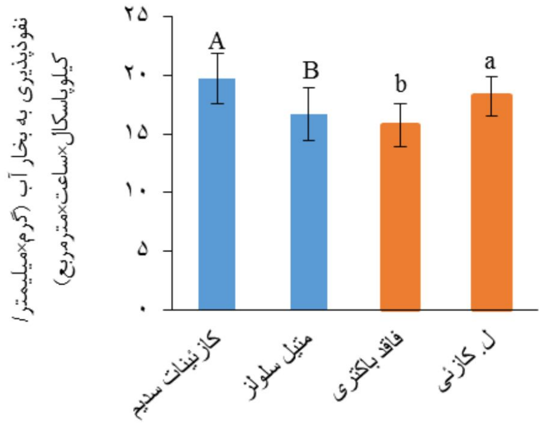



**شکل3 - اثر نوع فیلم (■) و باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 (■) بر مقدار نفوذپذیری به بخار آب نمونه‌های فیلم.**

حروف بزرگ و کوچک غیرمشابه بالای هر ستون به ترتیب بیانگر تفاوت اثر معنی دار نوع فیلم و حضور باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 می‌باشند ($p<0/05$).




**شکل4- تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطع عرضی فیلم متیل سلولز(الف) و کازئینات سدیم(ب) با بزرگنمایی×5000.**

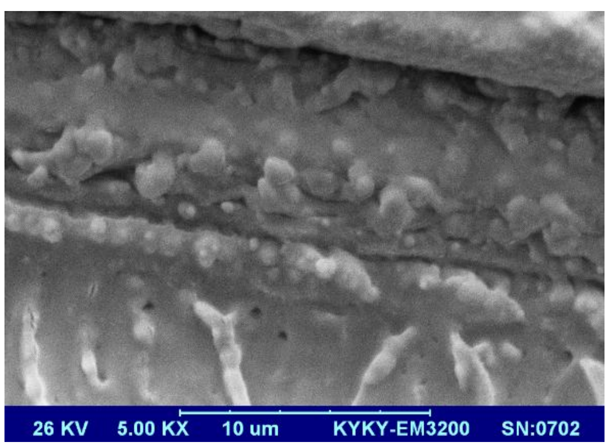



**شکل5 - اثر نوع فیلم (■) و باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 (■) بر مقدار نفوذ پذیری به بخار آب نمونه های فیلم.**

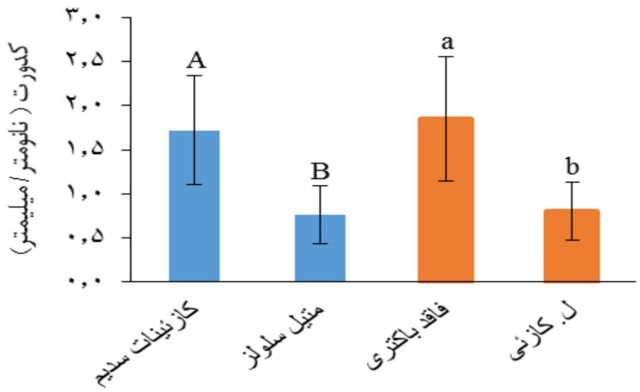
حروف بزرگ و کوچک غیرمشابه بالای هر ستون به ترتیب بیانگر تفاوت اثر معنی‌دار نوع فیلم و حضور باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 می‌باشند ($p<0/05$).

**کدورت**

ویژگی کدورت فیلم‌ها به دلیل تاثیر مستقیم بر ظاهر محصولات بسیار مهم است. عواملی چون قابلیت کریستالیزاسیون، انـدازه ذرات، نوع و مقدار نرم‌کننده، روش آماده‌سازی و همچنین ضریب انعکاس از مهمترین عوامل موثر در شفافیت فیلم می‌باشـد (Fakhouri *et al.*, 2013). نتایج حاصل از ارزیابی کدورت نمونه‌هـای فـیلم در شـکل7 نشان داده شده است. آنالیز داده‌های بدست آمده نشان می‌دهد نـوع فیلم در مقدار کدورت تاثیر معنی‌داری دارد ($p<0/05$). بـه‌طـوری‌کـه فیلم متیل سلولز نسبت به کازئینات سدیم شفاف‌تر اسـت ($p<0/05$). بر طبق نظریه Randazzo و همکاران (2016) سـاختار یکنواخـت و همگن فیلم (شکل4) می‌تواند سبب شفافیت بیشتر آن گردد.




**شکل6- تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطع عرضی فیلم متیل سلولز حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی PTCC 1608*. با بزرگنمایی ×5000.**




**شکل7- اثر نوع فیلم (■) و باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 (■) بر مقدار کدورت نمونه های فیلم.** حروف بزرگ و کوچک غیر مشابه بالای هر ستون به ترتیب بیانگر تفاوت اثر معنی دار نوع فیلم و

نتایج به‌دست آمده در شکل 7 بیـانگر آن اسـت کـه حضـور *ل. کازئی* 1608 باعث کاهش کدورت فیلم‌هـا شـده اسـت. Sanchez-Gonzalez و همکاران (2014) تاثیر حضور باکتری اسیدلاکتیک بـر شفافیت فیلم‌های خوراکی را بررسـی نمـوده و بیـان داشـتند حضـور باکتری اسیدلاکتیک باعث شفافیت بیشتر فیلم می‌شود کـه احتمـالا می‌تواند ناشی از افزایش محتوی رطوبت فیلم می‌باشد. Kanmani و همکاران (2013) بیـان داشـتند حضـور لاکتوباسـیلوس‌هـا در فـیلم پلولان/ نشاسته سبب افزایش کدورت گردیدکه می‌تواند بدلیل تفاوت فرمولاسیون نوع فیلم‌ها باشد.

## نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد فیلم‌هـای تهیـه شـده از پلیمرهـای متیل‌سلولز و کازئینات سـدیم از پتانسـیل مناسـبی جهـت نگهـداری باکتری *ل. کازئی* 1608 برخـوردار بـوده و بـه‌خـوبی دارای فعالیـت ضدلیستریایی هستند. هرچند قابلیت زنده مانی باکتری اسید لاکتیک در ماتریکس کازئینات سدیم بیشتر بود. حضـور *ل. کـازئی* 1608 در فرمولاسیون فیلم سبب افـزایش شـفافیت، افـزایش کشـش‌پـذیری، کاهش مدول الاستیسیته و مقاومت کششی نسبت به نمونـه کنتـرل گردید. نتایج به‌دست آمده نشان دادند تهیه لفـاف‌هـای بسـته‌بنـدی خوراکی با استفاده از بیوپلیمرهـای زیسـت‌تخریـب پـذیر همـراه بـا باکتری‌های اسید لاکتیک از قابلیت‌های منحصـر بفـردی برخـوردار است که می‌تواند در توسعه فیلم‌های ضـدمیکروبی،کاهش مشـکلات زیست محیطی و نیز افزایش انبارمانی فـرآورده‌هـای گوشـتی مـوثر باشند.

## منابع


Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M. & Abadias, M., 2011, Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus GG*. Food Microbiology, 28, 59-66.

ASTM, 2001, Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882 ASTM, Annual book of ASTM, pp. 162-170.

Aminabhavi, T. M., Balundgi, R. H., & Cassidy, P. E., 2008, A review on biodegradable plastics. Polymer-Plastics Technology and Engineering, 29, 235-262.

Banada, P. P., Guo, S., Bayraktar, B., Bae, E., Rajwa, B., Robinson, J. P., & Bhunia, A. K. (2007). Optical forward scattering for detection of *Listeria monocytogenes* and other Listeria species. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8), 1664-1671.

Barmpalia, I. M., Koutsoumanis, K. P., Geornaras, I., Belk, K. E., Scanga, J. A., Kendall, P. A., Smith, G. C. & Sofos, J. N., 2005, Effect of antimicrobials as ingredients of pork bologna for *Listeria monocytogenes* control during storage at 4 or 10 °C. *Food Microbiology*, 22, 205–211.

Beristain-Bauza, S. C., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A., 2016, Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Control*, 62, 44–51.

Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R., 2010, an acid/alkaline stress and theaddition of amino acids induce a

prolonged viability of Lactobacillus plantarumloaded into alginate gel. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 242-246.

Bourtoom, T., 2008, Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237-248.

Broumand, A., Emam-Djomeh, Z., Manouchehr, H., & Razavi, S, H.**,** 2011, Antimicrobial, water vapour permeability, mechanical and thermal properties of casein based Zataraia multiflora Boiss. Extract containing film. *LWT - Food science and Technology*, 44, 2316-2323.

Castro, K. A.D.F., Moura, N. M.M., Fernandes,A., Faustino, M. A. F., Simoes, M. M.Q., Cavaleiro, J. A.S., Nakagaki, S., Almeida, A., Cunha, A., Silvestre, A. J.D., Freire, C. S.R., Pinto, R. J.B., & Neves, M. d. G. P.M.S., 2017, Control of Listeria innocua biofilms by biocompatible photodynamic antifouling chitosan based materials. *Dyes and Pigments*, 137, 265-276.

Chambi, H., & Grosso, C, 2006, Edible films produced with gelatin and casein cross linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39, 458–466.

Corcoran, B. M., Stanton,C., Fitzgerald,G. F. & Ross,R. P., 2007, Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. *Microbiology*, 153, 291–299.

Fakhouri, F. M., Costa, D., Yamashita, F., Martelli, S. M., Jesus, R. C., & Alganer, K., 2013, Comparative study of processing methods for starch/gelatin films.*Carbohydrate Polymers*, 95(2), 681-689.

Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A., 2011, Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food science & Technology*, 22(6), 292-303.

Galotto, M. J., Guarda, A., & Lopez de Dicastillo, C., 2015, Antimicrobial active polymers in food packaging. In G. Cirillo, F. Iemma, & U. G. Spirizzi (Eds.), Functional polymers in food science (1st ed.). *New Jersey, USA: scrivener Publishing Editorial*.

Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L., & Ben Omar, N., 2007, Bacteriocin-basedstrategies for food biopreservation. International *Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 51-70.

Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G. & Koutsoumanis, K. P., 2010, Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43, 2402–2408.

Jayasena, D. D., & Jo, C.**,** 2013, Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food science & Technology*, 34, 96-108.

Kanmani, P., & Lim, S. T., 2013, Development and characterization of novel probiotic residing pullulan/starch edible films. *Food Chemistry*, 141, 1041–1049.

Kristo, E., Koutsoumanis, K. P. & Biliaderis, C. G., 2008, Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22, 373-386.

Léonard, L., Degraeve, P., Gharsallaoui, A., Saurel, R. & Oulahal, N., 2014, Design of biopolymeric matrices entrapping bioprotective lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* growth: Comparison of alginate and alginate-caseinate matrices entrapping *Lactococcus lactis subsp. lactis* cells. *Food Control*, 37, 200-209.

Martinez, R. C. R. & De Martinis, E. C. P., 2005, Evaluation of bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* 1 against *Listeria monocytogenes* 1/2a growth and haemolytic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 83-87.

Nú nez-Flores, R., Gimenez, B., Fernandez-Martn, F., Lopez-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gomez-Guillen, M. C., 2012, Role of lignosulphonate in properties of fish gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 60-71.

Odila Pereira, J., Soares, J., Sousa, S., Raquel Madureira, Ana. Gomes, Ana. & Pintado, M., 2016, Edible films as carrier for lactic acid bacteria. LWT - *Food science and Technology*, 73, 543-550.

Randazzo, W., Jimenez-Belenguer, A., Settanni, L., Perdones, A., Moschetti, M., Palazzolo, E., Guarrasi, V., Vargas, M., Antonietta German, M., & Moschetti, G., 2016, Antilisterial effect of citrus essential oils and their performance in edible film formulations. *Food Control*, 59, 750-758.

Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I. & Chiralt, A.**,** 2013, Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33, 92-98.

Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I. & Chiralt, A., 2014, Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. *Food Control*, 35, 200-206.

Seyedi, S., Koocheki, A., Mohebbi, M., & Zahedi, Y., 2014, Lepidium perfoliatum seed gum: A new source of carbohydrate tomake a biodegradable film.*Carbohydrate Polymers*, 101, 349– 358.

Schou, M., Longares, A., Montesinos-Herrero, C., Monahan, F. J., O'Riordan, D., & O'sullivan, M., 2004, Properties of edible sodium caseinate film and their application as food wrapping. LWT- *food science and technology*, 38, 605-610.

Vescovo, M., Scolari, G., & Zacconi, C., 2006, Inhibition of Listeria innocua growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. *Food Microbiology*, 23, 686-693.

Zheng, L. Y., & Zhu, J. F., 2003, Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527–530.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 2, June. July. 2018, p. 347- 357

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 2، خرداد- تیر 1397، ص 357 - 347

# Preparation of anti-Listeria films by using methyl cellulose, sodium caseinate biopolymers and *Lactobacillus casei* PTCC 1608

**H. Ghayoomi[1], M. A. Najafi[1]*, N. Soltani Tehrani[1], M. Rahnama[2]**

Received: 2016.11.15
Accepted: 2017.03.15

**Introduction:** The environmental problems of plastic materials have increased the importance of renewable edible films. In the manufacture of edible films, hydrocolloid compounds such as methyl cellulose and sodium caseinate are usually employed. Methyl cellulose is a biopolymer, soluble in water, and has substantial inhibitory properties against oxygen and lipids. Sodium caseinate has favorable mechanical properties and a high inhibitory effect on air transmission. Furthermore, it possesses good nutritional value. One of the most notorious pathogenic bacteria in food is the *Listeria spp.* which hastens food decay. *Listeria monocytogenes* is one of the most harmful species of bacteria that causes disease in humans. Lactic acid bacteria can inhibit the growth of cells that cause decay in food. The use of lactic acid bacteria in food has been made legal by the Food and Drug Administration of the United States of America (FDA). In this study, *Lactobacillus casei* PTCC1608 (*L. casei* 1608) was added directly to the film forming solution. The primary effect of *L. casei 1608* and film type, i.e. sodium caseinate and methylcellulose polymers, were evaluated based on mechanical properties, water vapor permeability (WVP) and the opacity of films. Anti-listeria features of the films were studied under experimental conditions as the films were prepared against the growth of *Listeria innocua* IBRC-M10799 (*L. innocua* 10799). The *L. innocua* 10799 was selected because of its non-pathogenicity and its physiological similarity with *Listeria monocytogenes*.

**Materials and methods:** *L. casei 1608* and *L. innocua* 10799 were purchased from credible organizations. The bacteria were prepared as lyophilization form. In order to propagate and prepare bacterial suspensions of *L. casei 1608* and *L. innocua* 10799, the cells were inoculated in the de Man Rogosa Sharpe Broth (MRS Broth, Liofilchem, Italy) and Blood Heat Infusion broth medium (BHI, Liofilchem, Italy), respectively. The cultures were then incubated at temperatures between 30 and 37°C, respectively, for 24 hour. The cells were harvested after centrifugation for 15 minutes at 3500 rpm (Eppendorf 5810 model, Germany). The collected medium was washed twice with a saline buffer solution. The population growth curve of *L. casei 1608* and *L. innocua* 10799 were obtained using the pour plate method and by using the UV-VIS spectrophotometer device (Cecil model, England) at OD= 600nm. In order to prepare the film formation solution of methyl cellulose (CAS 9004-67-5, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), four grams of powder and 1 g of glycerol were mixed with 100 ml sterilized distilled water. After homogenization and degassing, the film forming solution was transferred to the plastic container. To prepare the film formation solution of sodium caseinate, 5 g of sodium caseinate powder (CAS 9005-46-3, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was added to distilled water along with 1.5 g of glycerol. The solution was planned to reach 100 ml and, after complete dissolution, the film formation solution warmed up to 85°C and then cooled. To prepare the bio-film, *L. casei* 1608 was added to the film forming solution until the number of *L. casei* 1608 in the dried film reached $10^6$ CFU/cm$^2$. The film formation solutions were transferred to plastic containers and were dried at 25°C for 24 hours. All films were placed in a desiccator at 25°C and 75% RH for one week. In order to evaluate the anti-listeria activity, the bio-films were put on tryptic soya agar (TSA) medium, inoculated with *L. casei* 1608 ($10^2$ CFU / cm$^2$) for 12 days at 5°C. The number of pathogenic bacteria and *L. casei* 1608 were counted on days 0, 4, 8 and 12. Also, the prepared films were evaluated according to the ASTM D-882 (ASTM, 2001) as per the ASTM D-882 instruction manual (Testometric, Model M350-10CT, UK). WVP was determined according to the ASTM-96-95. The opacity of the films were assessed by using the spectrophotometric apparatus according to the method described by Nu nez-Flores *et al*. (2012). Comparing the mean values of data was based on a factorial experiment in a completely randomized design (CRD) with three replications, by the SAS software version 9.1. The chemical and microbial mean values were calculated using Duncan's and Tukey's tests, respectively.

1. Food Science and Technology Department, Faculty of Agriculture, Zabol University, Bonjar Ave, Zabol, Iran
2. Health and Food Quality Control Department, Faculty of Veterinary, Zabol University, Bonjar Ave, Zabol, Iran
(*Corresponding author: E-mail addresses: m.najafi413@uoz.ac.ir, Najafi413@yahoo.com)

**Results & Discussion:** Data analysis showed that the bio-caseinate film hosted the highest survival rate of *L. casei* 1608 on the eighth day of culture (123.8%) when *L. casei* was concurrently present with *L. innocua* 10799. Analysis of data by the bio-methyl cellulose film showed that the strongest inhibitory effect on the growth rate of *L. innocua* 10799 was observed on the fourth day of the 12-day experimental duration ($P<0.05$). Furthermore, the weakest inhibitory effect on the growth rate was observed in pure films ($P>0.05$). Laboratory evaluations showed that the presence of lactic acid bacteria in films significantly increased the transparency, WVP and amount of elasticity. Nonetheless, a significant decrease in tensile strength and modulus of elasticity was observed. The type of matrix had a significant effect on mechanical properties. By comparing the methyl cellulose matrix and the sodium caseinate, it was observed that the methyl cellulose matrix showed significantly greater elasticity, tensile strength and higher modulus of elasticity while having less WVP and less opacity ($p<0.05$). The results of this study showed that sodium caseinate and methylcellulose films can exhibit anti-listeria properties when the films contain *L. casei* 1608. Accordingly, these processed films could be used as a suitable method for the storage and packaging of food. The approaches of this study are therefore effective in developing antimicrobial films.

**Key words:** Biopolymer, Lactic acid bacteria, *L. innocua*